

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-503030
(P2003-503030A)

(43) 公表日 平成15年1月28日 (2003.1.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマート* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/19	4 B 0 2 4
1/19		C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:84	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 15/00	Z N A A
			A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-505718(P2001-505718)
(86) (22) 出願日 平成12年6月16日 (2000.6.16)
(85) 翻訳文提出日 平成13年12月25日 (2001.12.25)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 1 6 6 7 1
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 7 8 9 7 8
(87) 国際公開日 平成12年12月28日 (2000.12.28)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 4 0 , 7 0 3
(32) 優先日 平成11年6月24日 (1999.6.24)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

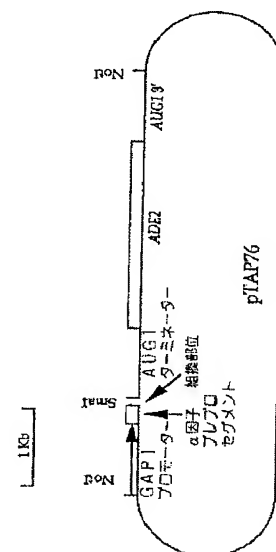
(71) 出願人 ザイモジェネティクス, インコーポレイテ
ィド
アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シ
アトル, イーストレイク アベニュー イー
スト 1201
(71) 出願人 ミラー, プラディー ジー.
アメリカ合衆国, テキサス 75206, ダラ
ス, ビレッジ ベンド ドライブ 6061
#1816
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピチア・メタノリカグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ1のプロモーター及びターミネーター

(57) 【要約】

ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ1遺伝子 (GAP1 遺伝子) の転写プロモーター及び転写ターミネーター配列が明らかにされている。これらの配列は、培養されたピチア・メタノリカ細胞における注目のタンパク質の生成のためのDNA構築体において有用である。発現ベクター内において、GAP1プロモーター及び/又はGAP1ターミネーターが、注目のタンパク質をコードしているDNAセグメントに機能的に連結されている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1のヌクレオチド810からヌクレオチド1724を含む、1500ヌクレオチド長までの単離されたDNA分子。

【請求項2】 下記の機能的に連結されたエレメントを含むDNA構築体：
配列番号：1のヌクレオチド733からヌクレオチド1732の配列の少なくとも一部を含む第一のDNAセグメントであり、ここで該部分が機能的転写プロモーターであるセグメント；

ピチア・メタノリカ (*Pichia Methanolica*) のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ以外の注目のタンパク質をコードしている第二のDNAセグメント；及び

転写ターミネーターを含む、第三のDNAセグメント。

【請求項3】 前記第一のDNAセグメントが、900～1500ヌクレオチド長である、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項4】 第一のDNAセグメントが、配列番号：1のヌクレオチド810からヌクレオチド1724を含む、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項5】 第一のDNAセグメントが、ピチア・メタノリカのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードしているDNAを本質的に含まない、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項6】 更に選択マーカーを含む、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項7】 更に第一及び第二のDNAセグメントに機能的に連結された分泌シグナル配列を含む、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項8】 分泌シグナル配列が、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の α -因子プレプロ配列である、請求項7記載のDNA構築体。

【請求項9】 前記第三のDNAセグメントが、ピチア・メタノリカのAUG1又はGAP1遺伝子の転写ターミネーターを含む、請求項2記載のDNA構築体。

【請求項10】 前記ターミネーターが、配列番号：1のヌクレオチド2735から2795を含む、請求項9記載のDNA構築体。

【請求項 11】 請求項 2 記載の DNA 構築体を含む、ピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 12】 DNA 構築体が、ゲノム操作により組込まれる、請求項 1 記載のピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 13】 DNA 構築体が、多コピーでゲノム操作により組込まれる、請求項 12 記載のピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 14】 第一の DNA セグメントが、900～1500 ヌクレオチド長である、請求項 11 記載のピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 15】 第一の DNA セグメントが、配列番号：1 のヌクレオチド 810 からヌクレオチド 1724 を含む、請求項 11 記載のピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 16】 細胞が、液胞型プロテアーゼであるプロテイナーゼ A 及びプロテイナーゼ B を機能欠損している、請求項 11 記載のピチア・メタノリカ細胞。

【請求項 17】 下記の工程を含む、注目のタンパク質の生成方法：
請求項 11 記載の細胞を培養し、これにより第二の DNA セグメントが発現され、かつ注目のタンパク質が生成される工程；及び
注目のタンパク質を回収する工程。

【請求項 18】 DNA 構築体が、多コピーでゲノムに組込まれている、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】 細胞が、液胞型プロテアーゼであるプロテイナーゼ A 及びプロテイナーゼ B を機能欠損している、請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】 下記の機能的に連結されたエレメントを含む DNA 構築体：
ピチア・メタノリカの遺伝子転写プロモーターを含む、第一の DNA セグメント；
ピチア・メタノリカのタンパク質以外の、注目のタンパク質をコードしている、第二の DNA セグメント；及び
配列番号：1 のヌクレオチド 2735 から 2795 を含む、第三の DNA セグメント。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

メチロトロフ性酵母は、炭素及びエネルギーの土壌給源としてメタノールを利用することができるような酵母である。メタノール利用に必要な生化学経路を有する酵母種は、4つの属*Hansenula*、*Pichia*、*Candida*、及び*Torulopsis*に分類される。これらの属は、細胞の形態及び増殖特性を基に若干人工的であり、かつ密接な遺伝子相関を反映していない (Billon-Grand、*Mycotaxon*、35:201-204, 1989; Kurtzman、*Mycologia*、84:72-76, 1992)。更に、これらの属内の全ての種がメタノールを炭素及びエネルギー給源として利用可能なわけではない。この分類の結果、ある属の個々の種の間には生理及び代謝において大きい差異が存在する。

【0002】

メチロトロフ性酵母は、いくつかの理由により組換えタンパク質生成システムにおいて使用するための魅力的候補である。第一に、いくつかのメチロトロフ性酵母は、最小限定培地上で高いバイオマスへと迅速に増殖することがわかっている。第二に、組換え発現カセットは、ゲノムに組込まれており、その結果有糸分裂時安定である。第三に、これらの酵母は、大量の組換えタンパク質の分泌が可能である。例えば、Faberら、*Yeast*、11:1331, 1995; Romanosら、*Yeast*、8:423, 1992; Creggら、*Bio/Technology*、11:905 1993; 米国特許第4, 855, 242号; 米国特許第4, 857, 467号; 米国特許第4, 879, 231号; 及び、米国特許第4, 929, 555号; 並びに、Raymondの米国特許第5, 716, 808号、第5, 736, 383号、第5, 854, 039号、及び第5, 888, 768号を参照のこと。

【0003】

既に発表されたメチロトロフ性酵母のための発現システムは、メタノール誘導可能な転写プロモーターの使用に大きく依存している。しかし、メタノール

で誘導された転写プロモーターの使用は、生成が商業レベルに規模拡大される際に問題が多い。発酵工程時に使用されたメタノールの全体の容量は、最終発酵容量の40%程度であることができ、かつ誘導のために必要なメタノールの容量1000リットル以上の発酵スケールは、複雑さ及び恐らく費用がかかる点を考慮せざる負えない。

当該技術分野において、工業用酵素及び医薬用タンパク質を含む、経済的に重要なポリペプチドの生成のためのメチロトロフ性酵母の使用を可能にする更なる材料及び方法が依然必要である。本発明は、このような物質及び方法、更には関連した他の利点を提供する。

【0004】

発明の概要

ある態様において、本発明は、配列番号：1のヌクレオチド810からヌクレオチド1724を含む、長さが最大1500ヌクレオチドの単離されたDNA分子を提供する。

本発明の第二の態様において、下記の機能的に連結されたエレメントを含むDNA構築体が提供される：ヌクレオチド733からヌクレオチド1732の配列番号：1の配列の少なくとも一部を含む、第一のDNAセグメントであり、ここでこの部分は、機能的転写プロモーターであるような、セグメント；ピチア・メタノリカグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ以外の注目のタンパク質をコードしている、第二のDNAセグメント；並びに、転写ターミネーターを含む、第三のDNAセグメント。ある実施態様において、第一のDNAセグメントは長さが900～1500ヌクレオチドである。別の実施態様において、第一のDNAセグメントは、長さが900～1000ヌクレオチドである。更なる実施態様において、第一のDNAセグメントは、配列番号：1のヌクレオチド810からヌクレオチド1724を含む。追加の実施態様において、第一のDNAセグメントは、ピチア・メタノリカグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードしているDNAを本質的に含まない。このDNA構築体は更に、ピチア・メタノリカ遺伝子、例えばピチア・メタノリカADE2遺伝子のような、選択マーカーを含む。このDNA構築体は、閉環状分子又は線状分子である。

その他の実施態様において、このDNA構築体は、更に分泌シグナル配列、例えば第一及び第二のDNAセグメントに機能的に連結されたサッカロイマイセス・セレビジエの α -因子プレプロ配列を含む。追加の実施態様において、第三のDNAセグメントは、ピチア・メタノリカのAUG1又はGAP1遺伝子の転写ターミネーターを含む。

【0005】

本発明の第三の態様において、先に記したDNA構築体を含むピチア・メタノリカ細胞が提供される。ある実施態様において、このDNA構築体は、ゲノムに組込まれている。関連する実施態様において、このDNA構築体は多コピーでゲノムに組込まれている。更なる実施態様において、ピチア・メタノリカ細胞は、液胞型プロテアーゼのプロテイナーゼA及びプロテイナーゼBが機能欠損している。

【0006】

第四の本発明の態様において、(a)先に記したピチア・メタノリカ細胞を培養し、これにより第二のDNAセグメントが発現されかつ注目のタンパク質が作出される工程、並びに(b)注目のタンパク質を回収する工程を含む、注目のタンパク質を生成する方法が提供される。

第五の本発明の態様において、下記のものが機能的に連結されたエレメントを含むDNA構築体が提供される：ピチア・メタノリカ遺伝子転写プロモーターを含む、第一のDNAセグメント；ピチア・メタノリカタンパク質以外の注目のタンパク質をコードしている、第二のDNAセグメント；並びに、配列番号：1のヌクレオチド2735から2795を含む、第三のDNAセグメント。

これら及び他の本発明の態様は、以下の本発明の詳細な説明及び添付図面を参照し、明らかになるであろう。

【0007】

発明の詳細な説明

用語「対立遺伝子変異」は本明細書において、遺伝子の代用形を意味するように使用される。対立遺伝子変異は、集団で存在することがわかっており、かつ突然変異により生じる。

「DNA構築体」は、天然には存在しない構成で組合せられかつ並置されたDNAセグメントを含むように、ヒトの介入により修飾されている、1本鎖又は2本鎖のいずれかのDNA分子である。

【0008】

「DNAセグメント」は、指定された属性を有する比較的大きいDNA分子の一部である。例えば、指定されたポリペプチドをコードしているDNAセグメントは、プラスミド又はプラスミド断片のような、5'から3'方向に読む場合に指定されたポリペプチドのアミノ酸配列をコードしているような比較的最長いDNA分子の一部である。

【0009】

用語「機能欠損」とは、野生型対応物の活性レベルと比較して活性が10%未満の細胞内発現を意味する。その発現レベルは、適当なアッセイで決定された場合、野生型対応物の活性の1%未満であることが多く、頻繁には0.01%未満であろう。一部の例において、活性が本質的に検出不能であることが望ましい（すなわち、バックグラウンド値よりも有意に高くない。）。遺伝子の機能欠損は、コード領域又は非コード領域のいずれかにおける突然変異により生じ得る。

本明細書において用語「遺伝子」は、ポリペプチドをコードしているDNAセグメントを意味するように使用される。文脈が許す限り、この用語は、ゲノムDNA（介在配列を伴う又は伴わない）、cDNA、及び合成DNAを含む。遺伝子は、プロモーターエレメントを含む非コード配列を含むことができる。

【0010】

用語「単離された」は、ポリヌクレオチドに適用される場合、該ポリヌクレオチドは、その天然の遺伝的環境から取り出されており、その結果他の外来の又は望ましくないコード配列を含まず、かつ遺伝子操作されたタンパク質生成システムにおける使用に適した形であることを意味する。このような単離された分子は、それらの天然の環境から分離されたものであり、かつcDNA及びゲノムクローンを含む。

「機能的に連結された」とは、DNAセグメントについて言及する場合、該セグメントが、それらの意図された目的、例えば転写が、プロモーターで始まりか

つコードセグメントを通してターミネーターに進むなどのために協力して機能するように、これらが配列されることを示している。

【0011】

「ポリヌクレオチド」は、5'末端から3'末端へと読まれたデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の1本鎖又は2本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを含み、かつ天然の給源から単離され、*in vitro*において合成されるか、もしくは天然分子及び合成分子の組合せから調製され得る。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対（略号「bp」）、ヌクレオチド（「nt」）、又はキロベース（「kb」）で表現される。文脈の許す場合、後者のふたつの用語は、1本鎖又は2本鎖であるポリヌクレオチドを説明することができる。これらの用語が2本鎖分子に適用される場合、これらは全長を意味するように使用され、かつ用語「塩基対」と同等であることは理解されるであろう。当業者には、2本鎖ポリヌクレオチドのふたつの鎖はわずかに長さが異なり、かつそれらの末端は酵素切断の結果場所がずれることができ；その結果2本鎖ポリヌクレオチド内の全てのヌクレオチドが対を成さないことがあることは認められるであろう。このような対を成さない末端は、一般に長さ20ntを超えないであろう。

「ポリペプチド」は、天然又は合成のいずれかにより生成された、ペプチド結合により連結したアミノ酸残基のポリマーである。約10個未満のアミノ酸残基のポリペプチドは、通常「ペプチド」と称される。

【0012】

本明細書において使用される用語「プロモーター」は、その技術分野において認められる意味において、RNAポリメラーゼの結合および転写開始に必要なものを提供するDNA配列を含む遺伝子の一部を意味する。プロモーター配列は通常、しかし常にではなく、遺伝子の5'側非コード領域に認められる。転写開始において機能するプロモーター内の配列は、コンセンサスヌクレオチド配列により特徴付けられることが多い。これらのプロモーターエレメントは、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、及び転写因子結合部位を含む。本発明で特に興味深いのは、コンセンサス配列CTTCC又はGGAAGで特徴付けられるG

c r l p 結合部位、及びR a p l p 結合部位である。概略的に、Watsonら編集、「Molecular Biology of the Gene」、第4版、The Benjamin/Cummings Publishing社、メロンパーク、CA、1987年を参照のこと。

【0013】

「プロ配列」は、分泌タンパク質をコードしている遺伝子の成熟コード配列の直ぐ5'側に通常存在するDNA配列である。このプロ配列は、該タンパク質は分泌経路を通じて移動するので、シス作動性シャペロンとして利用されるプロペプチドをコードしている。

「タンパク質」は、1個以上のポリペプチド鎖を含む巨大分子である。タンパク質は更に、糖鎖基のような、非ペプチド成分も含む。糖鎖及び他の非ペプチド置換基は、該タンパク質が生成される細胞によりタンパク質に追加することができ、かつ細胞の種類で変動するであろう。タンパク質は、通常それらのアミノ酸主鎖構造に関して定義され；糖鎖基のような置換基は概して指定されることはないが、それにもかかわらず存在してよい。

【0014】

用語「分泌シグナル配列」は、比較的大きいポリペプチドの成分として、それが合成される細胞の分泌経路を介して比較的大きいポリペプチドを示すようなポリペプチド（「分泌ペプチド」）をコードしているDNA配列を意味する。比較的大きいポリペプチドは、一般に分泌経路を通して移動する間に分泌ペプチドを取除くように切断される。分泌ペプチド及びプロペプチドは、まとめてプレプロペプチドと称することができる。

【0015】

本発明は、ピチア・メタノリカのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）遺伝子プロモーターを含む単離されたDNA分子を提供する。本発明は更に、ピチア・メタノリカのGAPDH遺伝子ターミネーターを含む単離されたDNA分子も提供する。このプロモーター及びターミネーターは、医薬又は産業上価値のあるタンパク質を含む、注目のタンパク質の生成方法において使用することができる。

【0016】

ピチア・メタノリカのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子プロモーター、コード領域、及びターミネーターを含むDNA分子の配列は、配列番号：1において示されている。この遺伝子はGAP1と称される。当業者は、配列番号：1が、ピチア・メタノリカGAP1遺伝子の単独の対立遺伝子を表していること、及び他の機能性（対立遺伝子変異体）がおそらく存在すること、及び対立遺伝子変異がプロモーター領域、コード領域、又はターミネーター領域に内のヌクレオチド変化を含み得ることを認めるであろう。

【0017】

配列番号：1において、GAPDHオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド1733-1735のメチオニンコドン (ATG) で始まる。転写プロモーターは、ATGの上流に配置される。遺伝子発現実験は、機能性プロモーターがGAP1遺伝子の約900ヌクレオチド5'側フランキング領域に含まれることを示している。このプロモーター配列の分析は、*Saccharomyces cerevisiae* プロモーターエレメントと相同の多くの配列の存在を明らかにしている。これらの配列は、ヌクレオチド1584-1591のコンセンサスTATAAAボックス、ヌクレオチド1355-1367のコンセンサスRap1p結合部位 (Graham及びChambers、Nuc. Acids Res.、22:124-130, 1994)、並びにヌクレオチド1225-1229、1286-1290、1295-1299、1313-1317、1351-1354、1370-1374、1389-1393、及び1457-1461の可能性のあるGcr1p結合部位 (Shore、Trends Genet.、10:408-412, 1994) を含む。理論に結びつけることを意図するものではないが、これらの配列は、サッカロマイセス・セレビジエのTDH3プロモーターにおけるそれらの相手方と同様の機能を発揮し得る、すなわち、これらは相同転写調節エレメントと結合することができると考えられている (Bitterら、Mol. Gen. Genet.、231:22-32, 1991)。ピチア・メタノリカGAP1プロモーターのコンセンサスGcr1p結合部位の周囲領域の突然変異は、プロモーター活性を破壊することがわかって

いる。

【0018】

本発明において転写プロモーターとして使用するための配列番号：1において示された配列の好ましい部分は、配列番号：1の5'側非コード領域の少なくとも900個の連続ヌクレオチドを、及び好ましくは配列番号：1に示された配列のヌクレオチド810からヌクレオチド1724を有するセグメントを含む。当業者は、ピチア・メタノリカGAP1遺伝子の5'側非コード領域の比較的長い部分も使用することができることを認めるであろう。従って本発明のプロモーター配列は、3'側方向においてヌクレオチド1732を通過する配列番号：1の配列を含み、かつ5'側方向はヌクレオチド232に及ぶ又はこれを超えることができる。操作を簡便かつ容易にするために、DNA構築体の発現において使用されるプロモーターは、一般に長さが1.5kbを超えず、かつ多くは長さ1.0kbを超えないであろう。

【0019】

下記実施例においてより詳細に説明されるように、ヌクレオチド810から1724の配列番号：1の配列は、機能的転写プロモーターを提供する。しかし追加のヌクレオチドは、この配列の末端のいずれか又は両方を取除くことができ、かつ得られる配列は、その、タンパク質、好ましくは通常のアッセイが容易に利用できるようなタンパク質をコードしている配列への結合により、プロモーター機能について試験された。

【0020】

本発明において、GAP1プロモーターが、配列番号：1のヌクレオチド1733で始まるような、GAP1遺伝子コード配列を実質的に含まないことが好ましい。本明細書において使用される用語「GAP1遺伝子コード配列を実質的に含まない」は、プロモーターDNAが、15個を超えないGAP1コード配列のヌクレオチドを、好ましくは10個を超えないヌクレオチドを、及びより好ましくは3個を超えないヌクレオチドを含むことを意味する。本発明のある実施態様において、GAP1プロモーターは、ピチア・メタノリカのGAP1遺伝子のコード配列を含まないように提供される。しかし当業者は、配列番号：1の開始A

TG（ヌクレオチド1733から1735）を含むGAP1遺伝子断片が、ATGを欠く異種コード配列に機能的に連結され、GAP1 ATGが異種配列の翻訳の開始のために提供されることを認めるであろう。当業者は更に、追加のGAP1コード配列も含むことができ、これによりGAP1配列及び異種アミノ酸配列を含む融合タンパク質が生成されることを認めるであろう。このような融合タンパク質は、その後の翻訳のためのGAP1配列及び異種配列の分離を促進する切断部位を含むことができる。

【0021】

本発明は、GAP1プロモーター配列に加えて、ピチア・メタノリカのGAP1遺伝子の3'側非コード領域由来の転写ターミネーター配列も提供する。コンセンサス転写終結配列（Chen及びMoore、Mol. Cell. Biol.、12:3470-3481, 1992）は、配列番号：1のヌクレオチド2774から2787である。従って本発明においては、少なくとも約60bp長の転写終結遺伝子セグメントが提供される。例えば少なくとも90bp長又は約200bp長のような、比較的長いセグメントが使用されることが多いであろう。これらのセグメントは、前述の終結配列を含み、かつそれらの5'側末端として配列番号：1のヌクレオチド2735を有し得る。しかし当業者は、発現ベクター中に提供される転写終結セグメントは、その5'側末端に配列番号：1のヌクレオチド2732-2734にTAA翻訳終結コドンを含み、終結コドンが欠損したコード配列の挿入を可能にすることを認めるであろう。

【0022】

クローン化されたDNA分子の操作及び外来性DNAの様々な宿主細胞への導入に関する技術は、当該技術分野において周知であり、かつ例えばSambrookらの「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、NY、1989；Murray編集、「Gene Transfer and Expression Protocols」、Humana Press、クリフトン、NJ、1991；Glick及びPasternak、「Molecular Biot

technology: Principles and Applications of Recombinant DNA」、ASM Press、ワシントンD. C.、1994; Ausubelら(編集)、「Short Protocols in Molecular Biology」、第3版、John Wiley and Sons, Inc.、NY、1995; Wuら、「Methods in Gene Biotechnology」、CRC Press、ニューヨーク、1997に説明されている。発現ベクターを含むDNAベクターは、通常細菌宿主(例えばE. coli)において機能する選択マーカー及び複製起点を含み、原核細胞宿主における該ベクターの複製及び増殖を可能にする。望ましいならば、これらの原核細胞エレメントは、代わりの宿主に導入する前に、ベクターから取り除くことができる。例えば、このような原核細胞配列は、ピチア・メタノリカ宿主細胞へのその導入前に、ベクターを線状化することにより取除くことができる。

【0023】

本発明のある実施態様において、注目のタンパク質をコードしている第二のDNAセグメントに機能的に連結された機能的転写プロモーターである配列番号：1の少なくとも配列の一部を有する第一のDNAセグメントを含む発現ベクターが提供される。注目のタンパク質が分泌されることが望ましい場合、ベクターは、更に第一及び第二のDNAセグメントに機能的に連結された分泌シグナル配列を含むであろう。分泌シグナル配列は、注目のタンパク質のものであるか、もしくは他の分泌されたタンパク質に、好ましくは分泌された酵母タンパク質に由来することができる。好ましいこのような酵母分泌シグナル配列は、サッカロマイセス・セレビジエ α 因子(MF α 1)プレプロ配列である(Kurjanら、米国特許第4,546,082号、及びBrake、米国特許第4,870,008号に開示)。

【0024】

本発明の別の実施態様において、注目のタンパク質をコードしている追加のDNAセグメントに機能的に連結された機能的転写ターミネーターである配列番号：1の一部を有するDNAセグメントを含む発現ベクターが提供される。ある実

施態様において、ピチア・メタノリカのGAP1プロモーター及びターミネーター配列が組合せて使用され、ここで両者は発現ベクター内の注目のタンパク質をコードしているDNAセグメントに機能的に連結されている。

【0025】

本発明の発現ベクターは更に、該ベクター含むピチア・メタノリカ細胞の同定及び選択を可能にする、選択マーカーを含む。選択マーカーは、これらを含む細胞の増殖にとっての利点を提供する。選択の一般的原理は当該技術分野において周知である。選択マーカーは、好ましくはピチア・メタノリカ遺伝子である。通常使用される選択マーカーは、アミノ酸又はヌクレオチドの合成に必要な酵素をコードしている遺伝子である。これらの遺伝子に変異を有する細胞は、特定のアミノ酸又はヌクレオチドを欠損した培地においては、その変異が選択マーカーにより補完されない限りは、増殖することができない。このような「選択」培養培地の使用は、宿主細胞における異種DNAの安定した維持を確実にする。ピチア・メタノリカにおいて使用されるこの種の選択マーカーの例は、ピチア・メタノリカADE2遺伝子であり、これはホスホリボシルー5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ(AIRC; EC 4.1.1.21)をコードしている。Raymondの米国特許第5,736,383号を参照のこと。このADE2遺伝子は、ade2宿主細胞へ形質転換される場合は、該細胞のアデニン不在下での増殖を可能にする。代表的ピチア・メタノリカADE2遺伝子配列のコード鎖は、配列番号：2に示されている。例示された配列は、5'側非コード配列の1006個のヌクレオチド及び3'側非コード配列の442個のヌクレオチドを、ヌクレオチド1007-1009の開始ATGコドンと共に含む。本発明のある実施態様において、ヌクレオチド407から2851を含むDNAセグメントは、選択マーカーとして使用されるが、比較的長い又は短いセグメントを、コード部位がプロモーター及びターミネーター配列に機能的に連結される限り、使用することができる。代わりに、野生型細胞に増殖利点を提供するドミナント選択マーカーを使用することができる。典型的ドミナント選択マーカーは、ネオマイシン-型抗生物質(例えばG418)、ヒグロマイシンB、及びブレオマイシン/フィレオマイシン-型抗生物質(例えばZeocin(登録商標): Invitro

ogen社より入手可能、サンディエゴ、CA)のような、抗生物質耐性を提供する遺伝子である。ピチア・メタノリカにおける使用のためのドミナント選択マーカーの例は、Zeocin (登録商標)の活性を阻害するShb1a遺伝子がある。

【0026】

組換えタンパク質作出のための宿主としてのピチア・メタノリカ細胞の使用は、WIPO公開である国際公開公報第97/17450号、国際公開公報第97/17451号、国際公開公報第98/02536号、及び国際公開公報第98/02565号；並びに米国特許第5,716,808号、第5,736,383号、第5,854,039号、及び第5,888,768号に開示されている。ピチア・メタノリカの形質転換において使用するための発現ベクターは、一般に、形質転換前に線状化されることが好ましいような、2本鎖環状プラスミドとして調製されるであろう。発現ベクターDNAの宿主染色体への組込みを促進するために、該プラスミドの発現セグメント全体が、宿主DNA配列により両端で隣接されている（例えばAUG1の3'側配列）。電気穿孔を用いて、注目のポリペプチドをコードしているDNAを含むプラスミドの、ピチア・メタノリカ細胞への導入が促進される。指数関数的に崩壊するパルス化された電界であり、電界強度2.5～4.5 kV/cm、好ましくは約3.75 kV/cmを有しかつ時定数(τ)1～40ミリ秒、最も好ましくは約20ミリ秒を用いる電気穿孔による、ピチア・メタノリカ細胞の形質転換が好ましい。

【0027】

組込み形質転換体が、タンパク質生成過程において使用するために好ましい。このような細胞は、DNAが該ゲノムから失われることは稀であるので、連続選択圧力 (continuous selective pressure) なしに増やすことができる。DNAの宿主染色体への組込みは、サザンブロット分析により確認することができる。簡単に述べると、形質転換された及び形質転換されない宿主DNAは、制限エンドヌクレアーゼにより消化され、電気泳動により分離され、支持膜に吸着され、かつ適当な宿主DNAセグメントによりプロービングされる。形質転換されない及び形質転換された細胞において認められる断片

のパターンの差異は、組込み形質転換の指標である。制限酵素及びプローブは、ゲノム断片の中からDNAセグメント（例えば、プロモーター、ターミネーター、異種DNA、及び選択マーカー配列）の形質転換を同定するために選択することができる。

【0028】

異種タンパク質の発現レベルの差異は、個々の単離体の間の発現カセットの組込み部位及びコピー数のような要因から生じる。従って、産生株を選択する前に発現レベルについて多くの単離体をスクリーニングすることは利点である。高い発現レベルを示す単離体は、通常所望の発現カセットの複数組込まれたコピーを含むであろう。様々な適当なスクリーニング法が利用可能である。例えば、形質転換体コロニーは、タンパク質に結合する膜（例えば、ニトロセルロース）で覆われたプレート上において増殖される。タンパク質は、分泌又はその後の溶解により細胞から放出され、かつ該膜に結合する。その後結合したタンパク質は、イムノアッセイを含む公知の方法を用いてアッセイされる。発現レベルのより正確な分析は、液体培地中での細胞の培養、及び馴化培地もしくは細胞溶解液の分析により、適宜得ることができる。培地及び溶解液由来のタンパク質の濃縮及び精製の方法は、注目のタンパク質により一部決まるであろう。当業者は、このような方法を容易に選択しかつ実践する。

【0029】

分泌タンパク質生成のために、PEP4遺伝子によりコードされた液胞型プロテアーゼであるプロテイナーゼA、及びPRB1遺伝子によりコードされたプロテイナーゼB中に機能欠損を有する宿主細胞を用いて、擬似タンパク質分解を最小化することができる。液胞型プロテアーゼ活性（及び従って液胞型プロテアーゼ欠損）が、サッカロマイセス・セレビジエのために開発されたもの及びJonesの論文（Methods Enzymol.、194:428-453, 1991）に記されたものなどのいくつかの公知のアッセイのいずれかを用いて測定される。このようなアッセイのひとつは、APNEオーバーレイアッセイ（overlay assay）であり、これはカルボキシペプチダーゼY（CpY）の活性を検出する。Wolf及びFinkの論文を参照のこと（J. Bact

、123:1150-1156, 1975)。チモーゲン（プロ）CpYは、プロテイナーゼA及びプロテイナーゼBにより活性化されるので、APNEアッセイは、概して液胞型プロテアーゼ活性の指標である。APNEオーバーレイアッセイは、カルボキシペプチダーゼYが媒介した、N-アセチル-L-フェニルアラニン-β-ナフチルエステル（APNE）からのβ-ナフトールの放出を検出し、これは、β-ナフトールのジアゾニウム塩Fast Garnet GBCとの反応により、不溶性の赤色色素の形成を生じる。アッセイプレート（例えばYEPDプレート）上で室温で増殖された細胞は、8ml RxMにオーバーレイされる。RxMは、寒天0.175g、H₂O 17.5ml及び1M Tris-HCl（pH7.4）5mlを混合し、この混合物を電子レンジにかけ寒天を溶解し、～55℃に冷却し、新たに調製したAPNE（ジメチルホルムアミド中2mg/ml）（Sigma Chemical社、セントルイス、MO）2.5mlを添加し、かつアッセイ直前に、Fast Garnet GBC塩（Sigma Chemical社）20mgを添加することにより調製される。このオーバーレイを固化し、発色を観察した。野生型コロニーは赤色であるのに対し、CpY欠損株は白色である。カルボキシペプチダーゼY活性は、ウェル試験によっても検出することができ、ここで細胞は、マイクロタイター試験プレートのウェル中に分配され、かつN-ベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリド（BTPNA）及びジメチルホルムアミドの存在下でインキュベーションされる。これらの細胞は、ジメチルホルムアミドにより透過性となり、かつ細胞内のCpYが、BTPNAのアミド結合を切断し、黄色生成物p-ニトロアニリンを生じる。CpYアッセイは、その活性が最終的にCpY活性の低下を生じる限りは、プロテアーゼ活性を低下するあらゆる変異を検出するであろう。

【0030】

ピチア・メタノリカ細胞は、適当な炭素、窒素及び微量の栄養素の給源を含む培地において、温度約25℃～35℃で培養される。液体培地には、小さいフラスコの振盪又は発酵槽の噴霧（sparging）のような、従来の方法により十分な曝気を提供される。適当なピチア・メタノリカの培養培地は、YEPD（2%D-グルコース、2%Bacto（登録商標）ペプトン（Difco

Laboratories社、デトロイト、MI)、1%Bacto(登録商標)酵母抽出物(Difco Laboratories社)、0.004%アデニン、0.006%L-ロイシン)である。

【0031】

大規模培養のために、ピチア・メタノリカ株の1~2個のコロニーが、新鮮な寒天プレート(例えばYEPD寒天)から採取され、かつ2リットルのバッフル付き振盪フラスコ中に入ったYEPDブロス250ml中に浮遊される。この培養物を、16~24時間、30℃及び振盪速度250rpmで増殖される。およそ50~80mlの接種物を、出発発酵槽容量1Lあたりに用いる(5~8容量%接種物)。

【0032】

好ましい発酵培地は、炭素給源としてのグルコース、無機アンモニア、カリウム、リン酸、鉄及びクエン酸を含有する可溶性培地である。本明細書において使用される用語「可溶性培地」とは、視認できる沈殿を含まない培地である。好ましくは、この培地は、リン酸ガラス(ヘキサメタリン酸ナトリウム)である。好ましい培地は、脱イオン水中に調製され、かつ硫酸カルシウムを含有しない。最小培地としては、培地が、酵母抽出物のようなポリペプチド又はペプチドを欠いていることが好ましい。しかし、酸加水分解されたカゼイン(例えば、カザアミノ酸又はアミカーゼ)を、望ましいならば培地に添加することができる。詳細な発酵培地は、下記化合物の混合により調製される： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (11.5g/L)、 K_2HPO_4 (2.60g/L)、 KH_2PO_4 (9.50g/L)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.40g/L)、及びクエン酸 (1.00g/L)。希釈した脱イオン水を添加し1リットルとした後、この溶液はオートクレーブで滅菌し、冷却し、かつその後下記を補充する：60% (w/v) グルコース溶液 (47.5ml/L)、10x微量金属溶液 (20.0ml/L)、1M MgSO_4 (20.0ml/L)、及びビタミン保存液 (2.00ml/L)。この10x微量金属溶液は、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100mM)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2mM)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8mM)、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8mM)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2mM)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1

mM)、 H_3BO_3 (8mM)、 KI (0.5mM)、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1mM)、チアミン (0.50g/L)、及びビオチン (5.00mg/L)。前記ビタミン保存溶液は、イノシトール (47.00g/L)、パントテン酸 (23.00g/L)、ピロドキシン (1.20g/L)、チアミン (5.00g/L)、及びビオチン (0.10g/L) を含有する。当業者は、これらの具体的な成分及び量を変動することができる。例えば硫酸アンモニウムを、塩化アンモニウムに変更することができ、もしくは、硫酸アンモニウムの量を例えば約11から約22g/Lへと変更することができる。

【0033】

微量金属及びビタミンの添加後、培地のpHは、典型的には、10% H_3PO_4 の添加によりpH4.5に調節する。一般に約10ml/Lを添加し、かつ更なる酸添加は必要ないであろう。発酵時に、そのpHは、生成されたタンパク質に応じて、5N NH_4OH と添加することにより、約3.5～約5.5に、又は約4.0～約5.0に維持される。

【0034】

具体的な発酵槽は、BIOFLO 3000発酵槽システム (New Brunswick Scientific Company社、エジソン、NJ) である。この発酵槽システムは、6L又は14Lのいずれかの発酵槽容器を取り扱うことができる。6L容器において行われる発酵は、培地3Lで調製されるのに対し、14L容器において行われる発酵は、培地6Lで調製される。発酵槽容器の操作温度は、典型的には発酵過程を通じて30℃にセットされるが、発現されるタンパク質に応じて温度を27～31℃の範囲とすることができる。この発酵はバッチ様式で開始される。最初に存在するグルコースは所要発酵実時間 (EFT) およそ10時間で消費されることが多く、この時点で供給されたグルコースは細胞量の増加を開始する。具体的な供給されるグルコースは、60% (w/v) グルコース900ml、50% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60ml、10x微量金属溶液60ml、及び1M MgSO_4 30mlを含有する。ピチア・メタノリカの発酵は確固としており、かつ飽和した溶存酸素の割合30%以上を維持するために、高度の攪拌、曝気及び酸素噴霧を必要としている。溶存酸素

の割合は、最適な発現及び増殖のために15%以下に落ちてはならない。このバイオマスは典型的には、EFT48時間で1Lにつき乾燥細胞質量約30～約80gに達する。

【0035】

本発明に従い生成されたタンパク質は、常法を用い宿主細胞から回収される。該タンパク質が細胞内に生成される場合、この細胞が収穫され（例えば遠心分離）、かつ細胞質成分を放出するように溶解される。溶解法は、酵素的及び機械的破壊を含む。次に粗抽出物は、公知の方法に従い分画され、具体的な方法は注目の特定のタンパク質によって決まるであろう。分泌されたタンパク質は、馴化培養培地から、標準方法を用いて回収され、更に特定のタンパク質について選択される。一般に、Scopes、「Protein Purification: Principles and Practice」（Springer-Verlag社、ニューヨーク、1994）を参照のこと。

【0036】

本発明の材料及び方法は、研究、産業、又は医薬において興味深いタンパク質を生成するために使用することができる。このようなタンパク質は、リパーゼ、セルラーゼ、及びプロテアーゼのような酵素類；プロテアーゼインヒビターを含む、酵素阻害剤；血小板由来増殖因子（PDGF）、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮増殖因子（EGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などの、増殖因子類；グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）；エリスロポイエチン、トロンボポイエチン、コロニー刺激因子、インターロイキン、及びインターロイキンアンタゴニストのような、サイトカイン類；インスリン、プロインスリン、レプチン（leptin）、及びグルカゴンのような、ホルモン類；並びに、短縮型で発現され得るような増殖因子受容体（「可溶性受容体」）を含む受容体、又は例えば免疫グロブリン定常領域配列との融合タンパク質などである。これら及び他のタンパク質をコードしているDNAは、当該技術分野において公知である。例えば米国特許第4,889,919号；第5,219,759号；第4,868,119号；第4,968,607号；第4,599,311号；第4,784,950号；第5,792,850号；第5,827,734号；第4,

703, 008号;第4, 431, 740号;及び第4, 762, 791号;並びに、W I P O公開である国際公開公報第95/21920号及び国際公開公報第96/22308号を参照のこと。

【0037】

本発明の材料及び方法は、糖鎖形成されていない医薬用タンパク質を作出するために使用することができる。ピチア・メタノリカ細胞を含む酵母細胞は、それらの哺乳類の対応物とは異なる糖鎖を伴う糖タンパク質を作出する。従って酵母細胞において作出された哺乳類の糖タンパク質は、哺乳類に導入された場合に、「異物」とみなされることができ、かつ例えばそれらの天然の糖鎖形成された対応物とは異なる薬物動態を示すことができる。

本発明は更に、下記の限定的でない実施例により詳述される。

【0038】

実施例

実施例1

ピチア・メタノリカGAP1遺伝子をクローニングするために、センス (Z C 1 1, 3 5 6 ; 配列番号 : 3) 及びアンチセンス (Z C 1 1, 3 5 7 ; 配列番号 : 4) のPCRプライマーをサッカロマイセス・セレビジエ、K l u y v e r o m y c e s l a c t i s、及びマウスのGAPDH遺伝子のコード領域を並置することによりデザインした。その後これらのプライマーを使用し、ピチア・メタノリカゲノムDNAを増幅した。増幅した608bp長の配列を回収し、かつ対応するサッカロマイセス・セレビジエGAPDH遺伝子配列と78.1%の相同性を有することがわかった。

【0039】

ピチア・メタノリカゲノムライブラリーを、2 μ 及びサッカロマイセス・セレビジエURA3配列を含むシャトルベクターである、ベクターpRS426 (C h r i s t i a n s o n ら、Gene、110:119-122, 1992) 中に構築し、サッカロマイセス・セレビジエにおいて増殖されるようにした。標準の手順に従い、ゲノムDNAを、菌株CBS6515から調製した。簡単に述べると、細胞を、増殖培地 (r i c h m e d i a) において一晚培養し、チモラ

ーゼでスフェロプラスト化し、かつSDSで溶解した。溶解液からDNAをエタノールで沈殿し、かつフェノール/クロロホルム混合液で抽出し、その後酢酸アンモニウム及びエタノールで沈殿した。DNA調製物のゲル電気泳動は、無傷の高分子量DNA及び認知可能量のRNAの存在を示した。このDNAを一連に希釈した酵素の存在下でインキュベーションすることにより、該DNAを部分的にSau 3 Aで消化した。消化物の試料を、電気泳動で分析し、断片のサイズ分布を決定した。4～12 kbの間のDNAの移動をゲルから切り出し、かつゲル切片から抽出した。次にこのサイズ分画したDNAを、BamHIで消化し、かつアルカリホスファターゼで処理したpRS426に連結した。反応混合物のアリコートを、電気穿孔装置 (Gene Pulser (登録商標) ; BioRad Laboratories社、ハーキュリーズ、CA) を製造業者の推奨に従って用い、E. coli MC1061細胞へと電気穿孔した。

【0040】

このライブラリーを、ピチア・メタノリカGAPDH遺伝子断片の配列決定した領域からデザインしたセンスプライマー (ZC11, 733 ; 配列番号 : 5) 及びアンチセンスプライマー (ZC11, 734 ; 配列番号 : 6) を使用し、PCRによりスクリーニングした。このPCR反応混合液を、94℃で1分間インキュベーションし ; それに続けて、94℃で1分、52℃で45秒、72℃で2分を34サイクル ; 並びに、終結サイクル94℃1分、54℃1分、72℃11分インキュベーションした。43個のライブラリープールから出発し、陽性プールを同定し、かつ個々のコロニーに分けた。ピチア・メタノリカGAPDH遺伝子をその挿入物として含むpRS426プラスミドを伴う単コロニーを単離した。該挿入物中のGAPDH遺伝子の配向並びに5'側及び3'側フランキング配列の長さを、DNA配列決定により推定した (配列番号 : 1) 。この遺伝子は、GAP1と称した。

【0041】

pGAPDHと称されるGAP1遺伝子を含むプラスミドは、ブダペスト条約に基づき、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) (マナッサス、VA) に、E. coli株MC1061形質転換体として寄託されている。こ

の寄託株には、寄託番号P T A-3、寄託日1999年5月4日が割当てられた。

【0042】

実施例2

クローニングされたピチア・メタノリカGAP1プロモーターを用いて、ベクターpCZR133中のAUG1プロモーターを置換することにより、発現カセットを構築した（米国特許第5,736,383号に開示されている）。プラスミドpCZR133は、複数のクローニング部位に隣接しているピチア・メタノリカのAUG1プロモーター及びターミネーター、並びにピチア・メタノリカのADE2選択マーカーを含む。GAP1プロモーター（配列番号：1のヌクレオチド810～1724）を、5'末端にNotI部位（配列番号：7；ZC12,586）並びに3'末端にEcoRI及びBamHI部位（配列番号：8；ZC12,565）を導入したプライマーを用いるPCRにより増幅した。この反応混合物を、94℃で1分間インキュベーションし；それに続けて、94℃で1分、52℃で1分、72℃で3分を34サイクル；並びに、終結サイクル94℃1分、54℃7分、72℃23分インキュベーションした。その後増幅したプロモーターを、ファージミドベクター（pBluescript（登録商標）；Stratagene社、ラホヤ、CA）へと平滑末端で連結した。このベクター中のプロモーターの配向を、制限分析により決定した。該プロモーターを、NotI-BamHI断片として単離した。プラスミドpCZR133を、NotI及びBamHIで消化し、かつ消化物をゲル上で電気泳動した。2種の断片であるAde2/終結断片及びpUC断片を回収した。pUC断片は脱リン酸化した。これらの2種のベクター断片及びプロモーターを、3部分連結により結合した。得られたプラスミドを、pBM/GAP（図1）と称した。

【0043】

第二のベクターであるpTAP76（図2）を構築した。このベクターは、pRS316（Sikorski及びHieter、Genetics、122：19-27,1989）骨格にクローニングされた、GAP1プロモーター、 α -因子プレプロ配列、SmaI切断部位、AUG1ターミネーター、ADE2選

択マーカー、並びにAUG1 3'側非コード配列を含む。このpTAP76ベクターを、SmaI部位において線状化し、かつ注目のDNA断片及びサッカロマイセス・セレビジエ中の2本鎖組換えリンカーと一緒にし、これにより注目の断片が、Raymondらの論文(BioTechniques、26:134-141, 1999)に記されたような相同的組換えにより、該ベクターに結合される。

【0044】

実施例3

GAP1プロモーターからの異種遺伝子の発現を、LacZ及びGFP(グリーン蛍光タンパク質)レポーター遺伝子を用いて試験した。これらの遺伝子を、EcoRI-BamHI断片として調製し、かつ個々にEcoRI、BamHIで消化したpBM/GAPに連結した。得られたプラスミド類を、ピチア・メタノリカ宿主細胞に形質転換し、かつこれらの細胞を、グルコース及びメタノールの両方の発酵条件において増殖した。両レポーター遺伝子は両方の条件下で発現し、このことは、クローン化したGAP1プロモーターを用い、ピチア・メタノリカ細胞において、異種遺伝子を構成的に発現することができることを示している。

【0045】

実施例4

液胞型プロテアーゼを欠損しているピチア・メタノリカ株を作出するために、PEP4及びPRB1遺伝子を同定しかつ破壊した。PEP4及びPRB1配列は、反応容量100 μ l当たり、100pmolプライマーDNA、供給された1X緩衝液(Boehringer Mannheim社、インディアナポリス、IN)、250 μ M dNTP、1~100pmolの鋳型DNA、及び1ユニットのTaqポリメラーゼを含有する反応混合液中におけるPCRにより増幅した。このDNAは、94 $^{\circ}$ C30秒;50 $^{\circ}$ C60秒;及び72 $^{\circ}$ C60秒の30サイクルで増幅した。

【0046】

サッカロマイセス・セレビジエ由来のPEP4配列(Ammereyら、Mo

1. *Cell. Biol.*、6: 2490-2499, 1986; Woolfordら、*Mol. Cell. Biol.*、6: 2500-2510, 1986) 及び *P. pastoris* (Gleesonら、米国特許第5, 324, 660号) をアライニングし、保存領域に相当するいくつかのセンス及びアンチセンスプライマーをデザインした。ひとつのプライマーセット ZC9118 (配列番号: 9) 及び ZC9464 (配列番号: 10) は、ゲノムDNAから予想されるサイズのPCR産物を作出し、かつこのセットを用いて、増幅領域に相当するゲノムクローンを同定した。このゲノムクローンの一部のDNA配列決定 (配列番号: 11に示す) は、サッカロマイセス・セレビジエ由来のプロテイナーゼAと70%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド (配列番号: 12) をコードしているオープンリーディングフレームを明らかにした。

【0047】

ピチア・メタノリカのPRB1の同定のためのプライマーは、サッカロマイセス・セレビジエ (Moehleら、*Mol. Cell. Biol.*、7: 4390-4399, 1987)、*P. pastoris* (Gleesonら、米国特許第5, 324, 660号)、及び *Kluyveromyces lactis* (Fleerら、国際公開公報第94/00579号) のPRB1遺伝子のアライニングを基にデザインした。ひとつのプライマーセット ZC9126 (配列番号: 13) 及び ZC9741 (配列番号: 14) は、ゲノムDNA (配列番号: 15) 由来の約400bp断片を増幅した。この産物を配列決定し、かつサッカロマイセス・セレビジエ由来のプロテイナーゼBと70%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド (配列番号: 16) をコードしていることを発見した。その後このPRBプライマーセットを用い、ピチア・メタノリカのPRB1遺伝子を包含しているゲノムクローンを同定した。

【0048】

ピチア・メタノリカPEP4及びPRB1遺伝子における欠失突然変異を、利用可能な制限酵素部位を用いて作出した。クローン化した遺伝子の制限地図を作成した。BamHI及びNcoI部位の間のおよそ500bp領域を欠失し、かつ配列番号: 11に示された配列のヌクレオチド1から393を含むことにより

、 $p e p 4 \Delta$ 対立遺伝子を作出した。 $N c o I$ 及び $E c o R V$ 部位の間のおよそ1 k b p領域を欠失し、かつ配列番号：15に示された配列を含むことにより、 $p r b 1 \Delta$ 対立遺伝子を作出した。クローン化した $P E P 4$ 及び $P R B 1$ 遺伝子を、 $p C Z R 1 3 9$ 、2.4 k b $S p e I$ $A D E 2$ 挿入物を保持するファージミドベクター ($p B l u e s c r i p t$ (登録商標) $I I$ $K S (+)$ 、 $S t r a t a g e n e$ 社、ラホヤ、CA) にサブクローン化し、欠失を作出した。 $P E P 4$ 遺伝子の場合、 $p C Z R 1 3 9$ に特有の $B a m H I$ 部位を、消化により取り除き、末端を埋め、かつ再連結した。その後このベクターを、 $E c o R I$ 及び $H i n d I I I$ での消化により線状化し、かつ $P E P 4$ 遺伝子に広がる約4 k bの $E c o R I-H i n d I I I$ 断片を、線状化したベクターに連結し、プラスミド $p C Z R 1 4 2$ を作出した。次に $p C Z R 1 4 2$ を $B a m H I$ 及び $N c o I$ で消化し約500 b p欠失を形成し、それらの末端を埋め、かつ該DNAに再連結することにより、プラスミド $p C Z R 1 4 3$ を作出した。 $P R B 1$ 遺伝子(～5 k b $X h o I-B a m H I$ 断片)を、 $p C Z R 1 3 9$ にサブクローン化し、かつ配列番号：15に示された配列を含む、内部 $E c o R V-N c o I$ 断片を欠失し、プラスミド $p C Z R 1 5 3$ を作出した。

【0049】

プラスミド $p C Z R 1 4 3$ を、独自の部位で切断する $A s p 7 1 8$ で線状化した。線状化したプラスミドを、ピチア・メタノリカ $P M A D 1 1$ 株(米国特許第5,736,383号に開示されたように作出された $a d e 2$ 変異体)に導入した。形質転換体を、 $A D E D S$ (表1)上で増殖し、 $A d e^{+}$ 形質転換体を同定した。2種類の白色の $A d e^{+}$ 形質転換体を分析した。ひとつの種類は、第一の($p r i m a r y$)形質転換プレート上で直ぐに生じ；第二のものは、不安定なピンク色の形質転換体コロニーの周辺上の白色乳頭($p a p i l l a e$)の迅速な成長として明らかになった。

【0050】

表1

$A D E D S$

0.056%— $A d e-T r p-T h r$ 粉末

0. 67%アミノ酸を伴わない酵母窒素ベース

2%D-グルコース

0. 5%200Xトリプトファン、トレオニン溶液、

18. 22%D-ソルビトール

-Ade-Tm-Thr 粉末

アルギニン3. 0g、アスパラギン酸5. 0g、ヒスチジン2. 0g、イソロイシン6. 0g、ロイシン8. 0g、リシン4. 0g、メチオニン2. 0g、フェニルアラニン6. 0g、セリン5. 0g、チロシン5. 0g、ウラシル4. 0g、及びバリン6. 0g（全てL-アミノ酸）を混合して作成した粉末

200Xトリプトファン、トレオニン溶液

H₂O中の3. 0%L-トレオニン、0. 8%L-トリプトファン

プレートに、1. 8%Bacto（登録商標）寒天（Difco Laboratories社）を添加

【0051】

サザンブロットを用いて、望ましい相同的組込み事象を受けた形質転換体を同定した。細胞ペースト100 μ lを、24～48時間YEPDプレートから掻取り、かつ水1mlで洗浄した。洗浄した細胞を、スフェロプラスト緩衝液（1. 2Mソルビトール、10mMクエン酸ナトリウム（pH7. 5）、10mM EDTA、10mM DTT、1mg/mlチモラーゼ100T）400 μ l中に再浮遊し、かつ37℃で10分間インキュベーションした。この細胞浮遊液に1%SDS400 μ lを添加し、室温で透明になるまで混合し、5M酢酸カリウム300 μ lを混入し、かつこの混合液を5分間微量遠心分離し透明化した。透明化した溶解液750 μ lを、等容量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、新しいチューブに600 μ lを移し、100%エタノール2容量を添加し、かつそのDNAを4℃、15分間の微量遠心分離により沈殿した。ペレットを、RNアーゼA100 μ g/mlを含有するTE（10mM Tris（pH8. 0）、1mM EDTA）50 μ l中に再浮遊した。DNA 10 μ l（およそ100ng）を、適当な酵素により、総容量100 μ l中で消化し、エタノール200 μ lで沈殿し、かつDNA負荷色素

(loading dye) 10 μ l 中に再浮遊した。このDNAを、0.7% アガロースゲルで分解し、かつ半乾燥ブロッティング装置 (BioRad Laboratories 社、リッチモンド、CA) においてナイロン膜 (Nytran N⁺、Amersham 社、アーリントンハイツ、IL) へと製造業者の指示に従い移した。移したDNAを変性し、中和し、かつStratalinker (Stratagene 社、ラホヤ、CA) を用い、UV光により膜に架橋させた。PEP4でのタンデム組込みを伴う株を同定するために、2種のプローブを用いた。ひとつは、PEP4の3'末端由来の1400bp EcoRI-HindIII断片である。第二は、PEP4の5'末端由来の2000bp BamHI-EcoRI断片である。これらの断片は、化学発光試薬を用いて検出した (ECL (登録商標) 直接標識キット; Amersham 社、アーリントンハイツ、IL)。

【0052】

前記遺伝子の野生型及び欠失型対立遺伝子をふたつ組縦列で収容している親株を、YEPDブロスにおいて一晚増殖し、ループアウトした (looped-out) Ad⁻株の作出をもたらした。その後これらの細胞を、アデニンを制限したYEPDプレート上に1プレート当り2000~5000コロニーの密度で播種し、30℃で3日間、及び室温で3日間増殖した。室温へのシフトは、稀なピンク色のAd⁻コロニーの着色を増強した。ループアウト株は、スクリーニングしたピンク色のAd⁻コロニー10,000コロニー当りおよそ1個の頻度で一貫して検出された。これらの株は、サザンブロット法又は欠失部位に広がるプライマーを用いるPCRにより、野生型又は変異型遺伝子の保持についてスクリーニングした。ade2-11 pep4 Δ 株は、PMAD 15と称した。

【0053】

次にPRB1遺伝子を、本質的に前述のように、プラスミドpCZR153を用いる形質転換により、PMAD15から欠失した。ブロットを、PRB1及びADE2遺伝子の内側部分についてPCR-作成したプローブでプロービングした。PRB1プローブは、pCZR150を作出するための、PRB1の2.6 kb ClaI-SpeI断片のファージミドベクターpBluescript

(登録商標) I I K S (+) へのサブクローニング、及びプライマー Z C 4 4 7 (配列番号: 1 7) 及び Z C 9 7 6 (配列番号: 1 8) を用いる P C R による望ましい領域の増幅により作成した。A D E 2 プローブは、プライマー Z C 9 0 7 9 (配列番号: 1 9) 及び Z C 9 0 8 0 (配列番号: 2 0) による、p C Z R 1 3 9 における A D E 2 遺伝子の増幅により作成した。得られる a d e 2 - 1 1 p e p 4 Δ p r b 1 Δ 株は P M A D 1 6 と称した。

【0054】

本発明の具体的な実施態様が本明細書において例証のために説明されているにもかかわらず、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、前述のことから様々な変更を行うことができることは明らかであろう。従って、本発明は、添付された「特許請求の範囲」以外に制限されるものではない。

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.
 Raymond, Christopher K.
 Vanaja, Erica
 Miller, Brady G.
 Sloan, James S.

<120> PICHIA METHANOLICA GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 1
 PROMOTER AND TERMINATOR

<130> 98-56PC

<150> US 60/140,703
 <151> 1999-06-24

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
 <211> 4409
 <212> DNA
 <213> Pichia methanolica

<220>
 <221> CDS
 <222> (1733)...(2734)

<400> 1

cccgggggat	cttattttct	gcaagaactt	aaccgagggg	catgtcaaac	caagcatact	60
gtaaaagaaa	tagccgatgg	tttatatata	tatatacttg	cgttagtaga	aacagtttat	120
gcatgcatgg	atgcaagaac	tcagatatca	ggttatcaag	aaacatggag	aaattcctaa	180
acagaaacgg	aattaatccg	aaattctcgg	tctcccaaag	aaaatagatg	cacaagctaa	240
tacagcttgc	taactagctt	caactttcaa	aaaaaattct	aagctattga	atattcatca	300
agataatagt	ctatataaag	atgtaaagtc	attattattg	ggatatataa	acgtcctata	360
tattgctgaa	atgttaggtg	tatgtactga	aaacaatcag	tttgagttta	ccagagagag	420
acgatggatc	tacagatcaa	tagagagaga	ataagatgag	aataagatga	ttaatagtga	480
gaggtagtag	ccactggcgg	gaggatgaaa	atatcccgga	taaacttaga	aagaaattaa	540
ttacacgtat	aggtaacatt	tggtattgtc	gaatctcaga	tcagttgatg	cctggaacag	600
atcgacttat	agatattatc	agatcataat	catgaggcga	ggtgcgacta	gtaccagggtg	660
atgatatat	gtttccggtt	atitcaataa	gttgacgtcg	ttgtgtgatt	gggaaggcgt	720
cggagtaaca	gaaacagtaa	cggtaacaagc	atcattatga	gttgagggta	tgtagggaag	780

cagttgtttg taagcatggt tacaaatgca atgcatgtta cgattggact acaattaaat	840
ccgaatgtac ctatataacg tgttgtagct gttgtgccgt aagtagcccg atactagatg	900
cttactacgt cactgatctg ttcggatctc agtccattca tgtgtcaaaa tagttagtag	960
ctaaggggga tacagggaag atgtttggtg cgattatcgg agggatgtgt cttctgaggg	1020
gggaggagag agggcgtgta aggagtttgt ttgtttgttt gtttgttgag agaagggggg	1080
gagaagaggg ggtggtgggc tgatggcaat tgatatagag ggagagtgtg cgtaaactgt	1140
ttagtgtggt ggcggtacgg ggtacactgt agagggggac attataatgg ttatgtgtat	1200
atgctgtata tatgaatata agtagggagt gactacacat tgcaattgat aatatgtgta	1260
tgtgtgcgca tcagtatata cactcggagg ttctgaaagc catcattgta ttggacgttt	1320
gaatggtatt agatgacttg ttgtactaga ggacggagaa tgggtgagtg gaagcaatag	1380
ataataatgg aaagtttgct cgggtggtgga cattggcccc gagtagtgat accgtcacct	1440
taaaattgca gttaggggat gatgctccgg ggcacgacct gccaaactaat ttaatagtcg	1500
tctaacgctg gaacaggtgt tgttccacaa gtatagtagt ttgttggttg gctggtcaaa	1560
tgctgccttg atccatcggt ttatatataa agactcactt ctctctctct tgttcaattg	1620
tttcacactc aactgcttct cccttatctt tttttttcc ctgttttatt ccccatgaa	1680
ctagatcaca tcttttcata ttacacactt ttatttatta taattacaca aa atg gct	1738
Met Ala	
1	
att aac gtt ggt att aac ggt ttc ggt aga atc ggt aga tta gtc ttg	1786
Ile Asn Val Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val Leu	
5 10 15	
aga gtt gct tta tca aga aag gac atc aac att gtt gct gtc aat gat	1834
Arg Val Ala Leu Ser Arg Lys Asp Ile Asn Ile Val Ala Val Asn Asp	
20 25 30	
cct ttc att gct gct gaa tac gct gct tac atg ttc aag tac gat tcc	1882
Pro Phe Ile Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Tyr Met Phe Lys Tyr Asp Ser	
35 40 45 50	
act cac ggt aag tac gcc gcc gaa gtt tcc agt gac ggt aaa tac tta	1930
Thr His Gly Lys Tyr Ala Gly Glu Val Ser Ser Asp Gly Lys Tyr Leu	
55 60 65	
atc att gat ggt aag aag att gaa gtt ttc caa gaa aga gac cca gtt	1978
Ile Ile Asp Gly Lys Lys Ile Glu Val Phe Gln Glu Arg Asp Pro Val	
70 75 80	
aac atc cca tgg ggt aaa gaa ggt gtc caa tac gtt att gac tcc act	2026
Asn Ile Pro Trp Gly Lys Glu Gly Val Gln Tyr Val Ile Asp Ser Thr	
85 90 95	

ggt gtt ttc act acc ttg gct ggt gct caa aag cac att gat gcc ggt Gly Val Phe Thr Thr Leu Ala Gly Ala Gln Lys His Ile Asp Ala Gly 100 105 110	2074
gct gaa aag gtt atc atc act gct cca tct gct gat gct cca atg ttc Ala Glu Lys Val Ile Ile Thr Ala Pro Ser Ala Asp Ala Pro Met Phe 115 120 125 130	2122
ggt gtt ggt gtt aac gaa aag gaa tac act tct gac ttg aag att gtt Val Val Gly Val Asn Glu Lys Glu Tyr Thr Ser Asp Leu Lys Ile Val 135 140 145	2170
tct aac gct tca tgt acc acc aac tgt ttg gct cca tta gct aag gtt Ser Asn Ala Ser Cys Thr Thr Asn Cys Leu Ala Pro Leu Ala Lys Val 150 155 160	2218
ggt aac gac aac ttt ggt att gaa tca ggt tta atg acc act gtc cac Val Asn Asp Asn Phe Gly Ile Glu Ser Gly Leu Met Thr Thr Val His 165 170 175	2266
tcc att acc gct acc caa aag acc gtc gat ggt cca tca cac aag gac Ser Ile Thr Ala Thr Gln Lys Thr Val Asp Gly Pro Ser His Lys Asp 180 185 190	2314
tgg aga ggt ggt aga act gct tcc ggt aac att atc cca tca tct act Trp Arg Gly Gly Arg Thr Ala Ser Gly Asn Ile Ile Pro Ser Ser Thr 195 200 205 210	2362
ggt gct gct aag gct gtt ggt aag gtt tta cct gtc tta gct ggt aag Gly Ala Ala Lys Ala Val Gly Lys Val Leu Pro Val Leu Ala Gly Lys 215 220 225	2410
tta acc ggt atg tct tta aga gtt cct act acc gat gtt tcc gtt gtt Leu Thr Gly Met Ser Leu Arg Val Pro Thr Thr Asp Val Ser Val Val 230 235 240	2458
gat tta acc gtt aac tta aag act cca acc act tac gaa gct att tgt Asp Leu Thr Val Asn Leu Lys Thr Pro Thr Thr Tyr Glu Ala Ile Cys 245 250 255	2506
gct gct atg aag aag gct tct gaa ggt gaa tta aag ggt gtt tta ggt Ala Ala Met Lys Lys Ala Ser Glu Gly Glu Leu Lys Gly Val Leu Gly 260 265 270	2554

tac act gaa gac gct gtt gtt tcc act gat ttc tta acc gat aac aga Tyr Thr Glu Asp Ala Val Val Ser Thr Asp Phe Leu Thr Asp Asn Arg 275 280 285 290	2602
tca tct atc ttt gat gct aag gct ggt atc tta tta acc cca act ttc Ser Ser Ile Phe Asp Ala Lys Ala Gly Ile Leu Leu Thr Pro Thr Phe 295 300 305	2650
gtt aag tta atc tct tgg tac gat aac gaa tac ggt tac tcc acc aga Val Lys Leu Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Tyr Gly Tyr Ser Thr Arg 310 315 320	2698
gtt gtt gat tta cta caa cac gtt gct tcc gct taa atcttacaat Val Val Asp Leu Leu Gln His Val Ala Ser Ala *	2744
325 330	
ctagattgtg aagtataagt aagcaaaaat tatatatata tttgtctttc atagtataag tatagttttc atgagaaata cagataaaca acaaaaaata agttcttttt gaaaaagtta gattttattc ttgaacttag taaaagcctt ccttttacag ctgcttactt acaaccttga aggctattgc ataagctcaa ttgaaaacga gtataatata ctgattttcaa ggtttaatta tctgtaattt tcaagtactt ccatacgtgg aaacctccca caattaacag caacacgaaa catccatcat ccaacaaccg agatgcggat taggcccga gagataatat ttttcggtgt ggcgggtggt tcaactccga acgcagcgca gccaaaagca aacagatgat ttagtgaact cttcttatga tagatttttg gctgattgag ttgatctgac ctgtgtggtt cgatcgaatt ctattgtgtt tgatgccctg gtagtggtgt gcttcatctt attgtgaagt gtgaatccta gcgattatgg catttgagcg ccaactacta gctctgacgg tagtggcttc tacgaatgta acttacaatt ctgctcaatt cgaacatctt ttcagtaaga gaagttatat atgtatgtgt gtatgtgtat gtaaatatac ataaccgctt gtgggggtga tttttggtt gtactgatgt gaaactcagt gctatcggat gatgctgtca ccaacaacag ctgcttaacc ttctttttac tattctgata cagaattagg aaagtttccg gatttgtgat gtgcggcttt ggttgccatt agtctccttt ttttgagggg aggagtgaag tgggtgcgtta tgtgccctga tccaatggt ttgaaagagg gagctaggga tagttaatgg gtagacctat gaacattgtg tattaatata ttgaaatata caaacataac ggctgaaaac agcaagaaat caaaaaggca caatttcaat ggtatataac ttcaataatg atagtaatag taatggtagt agttattaca ggaggaataa tatcaagaaa ggaactaa aagtacacca acgtattcag aaatacaaaa acagcgaaca aaatcgtcga ttagtaattc atatcatgat tgccatccaa acagctttct ttcatgaac tcacgagggc ttgcactatt ttccctgctt gatgagtaat ccatcatttc aaactcgggt gaacctgtag caccagaagc gccatttgac gtaattggcc ttgtaatttg ctggtgtgtg tgggatatgt ttgattcatt ttggaaacgt tcatgatgcc ctcttttttt gttgtttgtt gttggtatcg gtgaattcga tctagatgca gaactgccac tattgtgtgt attgccgttg ttcgcatat tgttatcgtc aaagtcaaag tcaagtaatg gaagaccaag ggaagcatca acacaaaaat cattcaacat cagtaaatcc gagtacgact taatggtatc tgcctgaatc	2804 2864 2924 2984 3044 3104 3164 3224 3284 3344 3404 3464 3524 3584 3644 3704 3764 3824 3884 3944 4004 4064 4124 4184 4244 4304

gttgcttgct gctgattatg ctgttggtgg ttttggtggt gctgtttcgc agtcagttgg 4364
 aaatgatcca ctgattctag agcggccgcc accgcggtgg agctc 4409

<210> 2

<211> 3077

<212> DNA

<213> *Pichia methanolica*

<400> 2

cagctgctct gctccttgat tcgtaattaa tgttatcctt ttactttgaa ctcttgctgg 60
 tccccaacag ggattccaat cgggtgctcag cgggatttcc catgagggtt ttgacaactt 120
 tattgatgct gcaaaaactt ttttagccgg gtttaagtaa ctgggcaata tttccaaagg 180
 ctgtggcggt tccacactcc ttgcttttca taatctctgt gtattgtttt attcgcattt 240
 tgattctctt attaccagtt atgtagaaag atcggcacaac aaaatatcaa cttttatctt 300
 gaacgctgac ccacggtttc aaataactat cagaactcta tagctatagg ggaagtttac 360
 tgcttgctta aagcggctaa aaagtgtttg gcaaatataa aaagctgtga caagtaggaa 420
 ctctgtataa gggccgattc gacttcgaaa gagcctaaaa acagtgacta ttggtgacgg 480
 aaaattgcta aaggagtact agggctgtag taataaataa tggacacagt gtacaacaat 540
 aaaagaatga cgctgtatgt cgtagcctgc acgagtagct cagtgttaga gcagcagatt 600
 gcaaatctgt tggtcaccgg ttcgatccgg tctcgggctt ccttttttgc tttttcgata 660
 tttgctggta ggaagcaagg tctagttttc gtcgtttcgg atggtttacg aaagtatcag 720
 ccatgagtgt ttccctctgg ctacctataa tatttattga tcggtctctc atgtgaatgt 780
 ttctttccaa gttcggcttt cagctcgtaa atgtgcaaga aatatttgac tccagcgacc 840
 tttcagagtc aaattaattt tcgctaacia tttgtgtttt tctggagaaa cctaaagatt 900
 taactgataa gtcgaatcaa catctttaaa tcttttagtt aagatctctg cagcggccag 960
 tattaacca tagcatattc acagggcatca catcggaaca ttcagaatgg actcgcaaac 1020
 tgtcgggatt ttaggtggtg gccaaacttg tcgtatgac gttgaagctg cacacagatt 1080
 gaatatcaaa actgtgattc tcgaaaatgg agaccaggct ccagcaaagc aaatcaacgc 1140
 tttagatgac catattgacg gctcattcaa tgatccaaaa gcaattgccg aattggctgc 1200
 caagtgtgat gttttaaccg ttgagattga acatgttgac actgatgcgt tggttgaagt 1260
 tcaaaaggca actggcatca aaatcttccc atcaccagaa actatttcat tgatcaaaga 1320
 taaatacttg caaaaagagc atttgattaa gaatggcatt gctgttgccg aatctttag 1380
 tgttgaaagt agcgcagcat cttagaaga agttggtgcc aaatacggct tcccatacat 1440
 gctaaaatct agaacaatgg cctatgacgg aagaggtaat tttgtgtca aagacaagtc 1500
 atatatactt gaagctttga aagttttaga tgacaggccg ttatagccg agaaatgggc 1560
 tccattttca aaggagttag ctgttatggt tgtgagatca atcgatggc aagtttatc 1620
 ctaccaact gttgaaacca tccacaaaaa caacatctgt cactgtgtct ttgtccagc 1680
 tagagttaac gatactgtcc aaaagaaggc ccaaattttg gctgacaacg ctgtcaaata 1740
 tttccaggt gctggtatct ttggtgtga aatgttttta ttacaaaatg gtgacttatt 1800
 agtcaacgaa attgccccaa gacctacaa ttctggtcac tataccatcg acgcttgtgt 1860
 cactcgcgaa tttgaagctc atgttagggc cattactggt ctacccatgc cgaagaactt 1920
 cacttggttg tgcactccat ctaccaagc tattatgttg aacgttttag gtggcgatga 1980
 gcaaacgggt gagttaaga tgtgtaaaag agcactagaa actcctcatg ctctgttta 2040

cttatacggg aagactacaa gaccaggcag aaaaatgggt cacattaata tagtttctca 2100
 atcaatgact gactgtgagc gtagattaca ttacatagaa ggtacgacta acagcatccc 2160
 tctcgaagaa cagtacacta cagattccat tccgggcact tcaagcaagc cattagtcgg 2220
 tgtcatcatg ggttccgatt cggacctacc agtcatgtct ctaggttgta atatattgaa 2280
 gcaatttaac gttccatttg aagtcactat cgtttccgct catagaaccc caciaaagaat 2340
 ggccaagtat gccattgatg ctcaaagag aggggtgaag tgcacattg ctggtgctgg 2400
 tgggtgccgct catttaccgg gaatgggtgc ggcgatgacg ccgctgcctg ttattggtgt 2460
 ccctgttaaa ggctctactt tggatgggtg tgattcacta cactccatcg ttcaaagcc 2520
 aagaggtatt cctgttgcta ctgtggctat taacaatgct actaacgctg ccttgctagc 2580
 tatcacaatc ttaggtgccg gcgatccaaa tacttgtctg caatggaagt ttatatgaac 2640
 aatatggaaa atgaagtttt gggcaaggct gaaaaattgg aaaatgggtg atatgaagaa 2700
 tacttgagta catacaagaa gtagaacctt ttatatattga tatagtactt actcaaagtc 2760
 ttaattgttc taactgttaa tttctgcttt gcatttctga aaagtttaag acaagaaatc 2820
 ttgaaatttc tagttgctcg taagaggaaa cttgcattca aataacatta acaataaatg 2880
 acaataatat attatttcaa cactgctata tggtagtttt ataggtttg ttaggatttg 2940
 agatattgct agcgcttata attatcctta attgttcac gacgcaaatac gacgcatttc 3000
 cacaaaaatt ttccgaacct gtttttact tctccagatc ttggtttagt atagcttttg 3060
 acacctaata cctgcag 3077

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC11.356

<400> 3

ttacatgttc aagtacgat

19

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC11.357

<400> 4

tgatttcac gtaagtgg

18

<210> 5

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC11.733

 <400> 5
 atcccatggg gtaaagaagg 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC11.734

 <400> 6
 ataccggtta acttaccagc 20

 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC12.586

 <400> 7
 ggtgcggccg caatgcatgt tacgattgg 29

 <210> 8
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC12.565

 <400> 8
 ctagataaaa gagaagaaga gccaaagact ccacaaaaca ttgca 45

 <210> 9

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC9118

 <400> 9
 acctcccagt aagcctt 17

 <210> 10
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC9464

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(17)
 <223> n = A,T,C or G

 <400> 10
 ttyggnaart tygaygg 17

 <210> 11
 <211> 421
 <212> DNA
 <213> Pichia methanolica

 <220>
 <221> CDS
 <222> (2)...(421)

 <400> 11
 g gaa ggt aac gtt tct cag gat act tta gct tta ggt gat tta gtt att 49
 Glu Gly Asn Val Ser Gln Asp Thr Leu Ala Leu Gly Asp Leu Val Ile
 1 5 10 15

 cca aaa caa gac ttt gcc gaa gct act tct gag cca ggt tta gca ttc 97
 Pro Lys Gln Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu Ala Phe
 20 25 30

<210> 12
<211> 140
<212> PRT
<213> Pichia methanolica

<400> 12
Glu Gly Asn Val Ser Gln Asp Thr Leu Ala Leu Gly Asp Leu Val Ile
1 5 10 15
Pro Lys Gln Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu Ala Phe
20 25 30
Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp Ser Ile
35 40 45
Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Asn Ala Leu Asn Leu Gly
50 55 60

Leu Leu Asp Glu Pro Gln Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr Asn Thr
 65 70 75 80
 Asn Glu Glu Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp Glu Ser
 85 90 95
 Lys Tyr Thr Gly Lys Val Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Glu Val Ser Leu Asp Gly Ile Ser Leu Gly Asp Glu Tyr Ala Pro
 115 120 125
 Leu Glu Gly His Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr
 130 135 140

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC9126

<400> 13

atgtcaacac atttacc

17

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC9741

<221> misc_feature

<222> (1)...(17)

<223> n = A.T.C or G

<400> 14

cayggnacnc aytgygc

17

<210> 15

<211> 368

<212> DNA

<213> Pichia methanolica

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(366)

<221> misc_feature

<222> (1)...(368)

<223> n = A,T,C or G

<400> 15

ggg	tcc	gna	cnc	atg	gtg	ttt	cta	aga	att	gcc	cac	att	gtt	gcc	gtc	48
Gly	Ser	Xaa	Xaa	Met	Val	Phe	Leu	Arg	Ile	Ala	His	Ile	Val	Ala	Val	
1				5				10						15		

aaa	gtt	tta	aga	tct	aac	ggg	tca	ggg	tct	atg	ccc	gat	gtt	gtc	aag	96
Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Met	Pro	Asp	Val	Val	Lys	
			20				25						30			

ggg	gtt	gaa	tat	gct	ccc	aat	gct	cac	ctt	gcg	gaa	gcc	aag	gct	aac	144
Gly	Val	Glu	Tyr	Ala	Pro	Asn	Ala	His	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Ala	Asn	
		35				40						45				

aag	agt	ggg	ttt	aaa	ggg	tct	acc	gcg	aac	atg	tca	tta	ggg	ggg	ggg	192
Lys	Ser	Gly	Phe	Lys	Gly	Ser	Thr	Ala	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	
	50					55					60					

aaa	tct	cca	gct	tta	gat	atg	tct	gtt	aac	gct	cct	gtt	aaa	gca	ggg	240
Lys	Ser	Pro	Ala	Leu	Asp	Met	Ser	Val	Asn	Ala	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	
65				70					75					80		

tta	cac	ttt	gcc	gtt	acc	gct	ggg	aac	gat	aac	act	gat	gca	tgt	aac	288
Leu	His	Phe	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Asp	Asn	Thr	Asp	Ala	Cys	Asn	
			85					90						95		

tat	tct	cca	gcc	act	act	gaa	aat	act	gtc	act	gtt	gtt	gct	tcc	act	336
Tyr	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Glu	Asn	Thr	Val	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Thr	
		100					105						110			

tta	tct	gat	tcg	aga	gct	gac	atg	tct	aac	tc						368
Leu	Ser	Asp	Ser	Arg	Ala	Asp	Met	Ser	Asn							
		115				120										

<210> 16

<211> 122

<212> PRT
 <213> Pichia methanolica
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(122)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 16
 Gly Ser Xaa Xaa Met Val Phe Leu Arg Ile Ala His Ile Val Ala Val
 1 5 10 15
 Lys Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly Ser Met Pro Asp Val Val Lys
 20 25 30
 Gly Val Glu Tyr Ala Pro Asn Ala His Leu Ala Glu Ala Lys Ala Asn
 35 40 45
 Lys Ser Gly Phe Lys Gly Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly
 50 55 60
 Lys Ser Pro Ala Leu Asp Met Ser Val Asn Ala Pro Val Lys Ala Gly
 65 70 75 80
 Leu His Phe Ala Val Thr Ala Gly Asn Asp Asn Thr Asp Ala Cys Asn
 85 90 95
 Tyr Ser Pro Ala Thr Thr Glu Asn Thr Val Thr Val Val Ala Ser Thr
 100 105 110
 Leu Ser Asp Ser Arg Ala Asp Met Ser Asn
 115 120

<210> 17
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC447

<400> 17
 taacaatttc acacagg

17

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC976

<400> 18
 cgttgtataaa cgacggcc 18

<210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC9079

<400> 19
 cagctgccta ggactagttt cctcttacga gcaactaga 39

<210> 20
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC9080

<400> 20
 tgatcaccta ggactagtga caagtaggaa ctcttgta 38

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ピチア・メタノリカの G A P 1 プロモーターを含むベクター p B M / G A P を図示している。

【図 2】

図 2 は、ベクター p T A P 7 6 を図示している。

【図1】

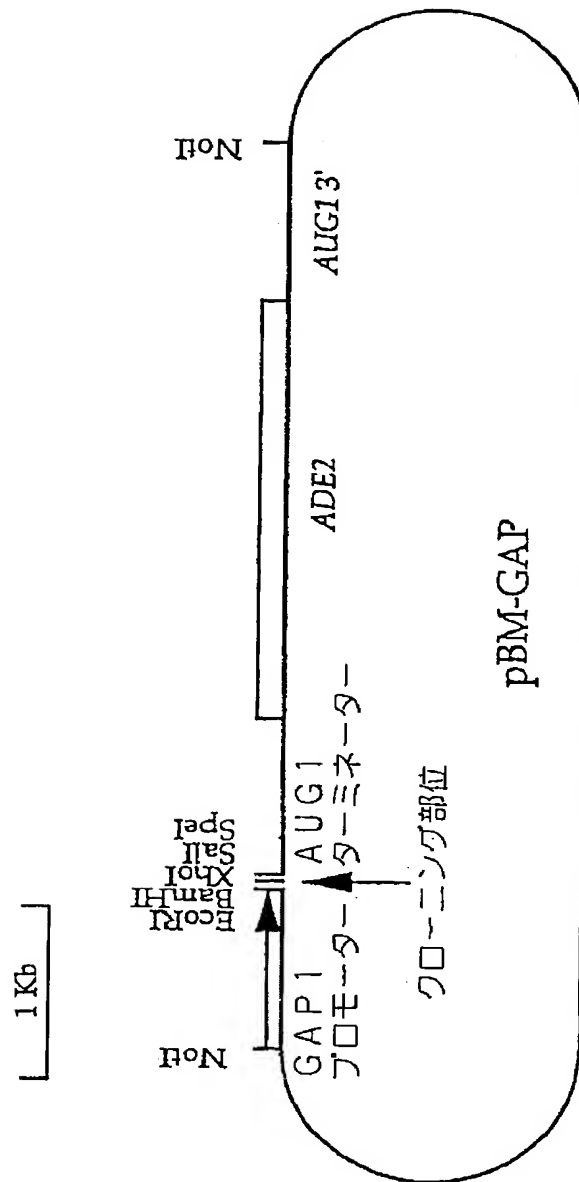


Fig. 1

【図2】

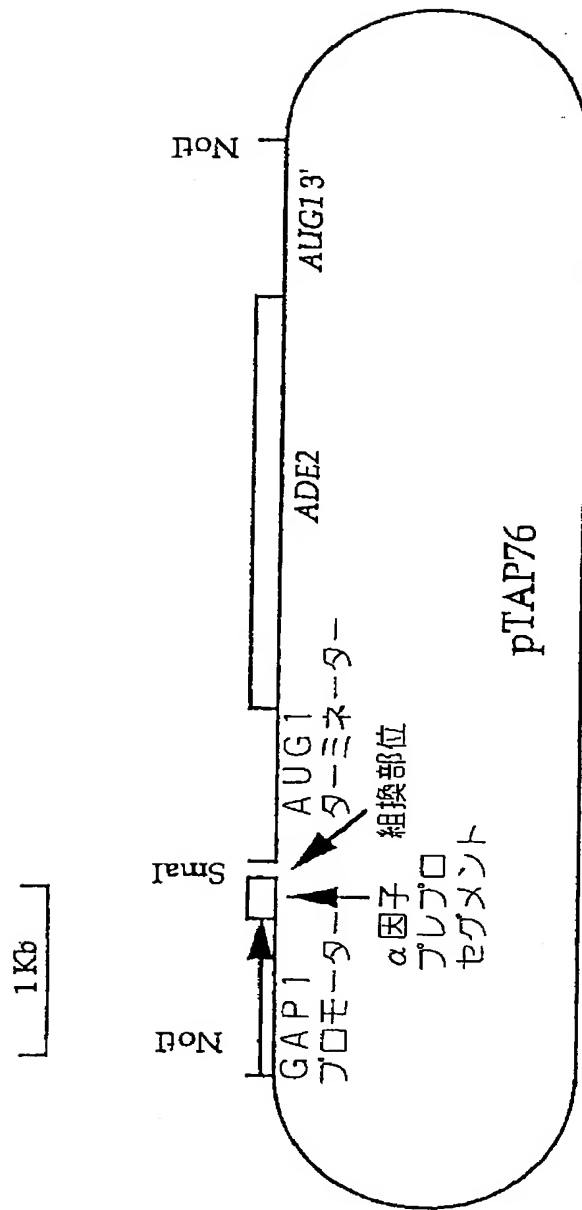


Fig. 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/16671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/81 C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 14347 A (ZYMOGENETICS INC) 25 March 1999 (1999-03-25) cited in the application	1-7, 9-20
Y	page 13, line 13 - line 36	8, 16
Y	WO 98 20035 A (UNIV AUTONOMA DE NUEVO LEON ;VIADER SALVADO JOSE MARIA (MX); BARRE) 14 May 1998 (1998-05-14) cited in the application abstract	8
X	WO 97 17450 A (ZYMOGENETICS INC) 15 May 1997 (1997-05-15)	1-7, 9-15, 17-20
Y	page 12, line 18 - page 13, line 12 page 30, line 7 page 36, line 11 - line 12	8, 16
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2000

Date of mailing of the international search report

18/10/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/16671

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 374 913 A (PHILLIPS PETROLEUM CO) 27 June 1990 (1990-06-27) the whole document	
A	EP 0 438 200 A (CIGB) 24 July 1991 (1991-07-24) abstract	
A	WATERHAM H R ET AL: "Isolation of the Pichia pastoris glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 186, no. 1, 20 February 1997 (1997-02-20), pages 37-44, XP004054877 ISSN: 0378-1119 the whole document	
A	DATABASE GENBANK 'Online! GI=2995611, Acc.no. U95625, 28 March 1998 (1998-03-28) SOHN, J.-H. ET AL.: "Pichia angusta glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene, complete cds." XP002149526 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Application No.
PCT/US 00/16671

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9914347 A	25-03-1999	AU 9231898 A	05-04-1999
		AU 9396498 A	05-04-1999
		EP 1015577 A	05-07-2000
		WO 9914320 A	25-03-1999
WO 9820035 A	14-05-1998	EP 0952158 A	27-10-1999
WO 9717450 A	15-05-1997	US 5955349 A	21-09-1999
		US 5716808 A	10-02-1998
		AU 1158297 A	29-05-1997
		AU 712650 B	11-11-1999
		AU 7673796 A	29-05-1997
		CA 2237039 A	15-05-1997
		CA 2237120 A	15-05-1997
		EP 0889966 A	13-01-1999
		EP 0862640 A	09-09-1998
		JP 2000500014 T	11-01-2000
		JP 2000500015 T	11-01-2000
		WO 9717451 A	15-05-1997
		US 6001597 A	14-12-1999
		US 5965389 A	12-10-1999
		US 5888768 A	30-03-1999
EP 0374913 A	27-06-1990	CA 2000101 A	22-06-1990
		DK 656289 A	23-06-1990
		JP 2222685 A	05-09-1990
		NO 894916 A	25-06-1990
EP 0438200 A	24-07-1991	CU 22276 B	06-09-1994
		CU 22278 B	06-09-1994
		CU 22287 B	06-09-1994
		CU 22288 B	06-09-1994
		JP 5184352 A	27-07-1993

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 R 1:84)			
(C 1 2 N 15/09			
C 1 2 R 1:84)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:84)			
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(71) 出願人 スローン, ジェイムズ エス. アメリカ合衆国, ワシントン 98028, ケンモア, ノースイースト ワンハンドレッド フィフティフォース ストリート 6423			
(72) 発明者 ミラー, ブラディー ジー. アメリカ合衆国, テキサス 75206, ダラス, ビレッジ ベンド ドライブ 6061 #1816			
(72) 発明者 スローン, ジェイムズ エス. アメリカ合衆国, ワシントン 98028, ケンモア, ノースイースト ワンハンドレッド フィフティフォース ストリート 6423			
(72) 発明者 レイモンド, クリストファー ケー. アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, ノースイースト エイティシックス ストリート 2626			
(72) 発明者 バナジャ, エリカ アメリカ合衆国, ワシントン 98103, シアトル, ノース シックスティフォース 2309			

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA04 DA12 EA04
FA02 FA07 FA20 GA11 HA01
HA03
4B064 AG01 CA06 CC24
4B065 AA77X AA77Y AA79Y AB01
BA01 CA24